Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr.med. U. Trendelenburg

STEREOSPEZIFITÄT DER NORADRENALINAUFNAHME IN DIE SYNAPTISCHEN VESIKEL DES RATTENGEHIRNS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Stephan Pramono
aus Kudus / Indonesien

Würzburg, den 15. Februar 1982

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. U. Trendelenburg

STEREOSPEZIFITÄT DER NORADRENALINAUFNAHME IN DIE SYNAPTISCHEN VESIKEL DES RATTENGEHIRNS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Stephan Pramono
aus Kudus / Indonesien

Würzburg, den 15. Februar 1982

Referent: Professor Dr.med. A. Philippu

Korreferent: Professor Dr.med. U. Trendelenbur

Dekan: Professor Dr.med. K.A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 21.5.1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	METHODE	4
	1. Präparation und Homogenisierung des Rattengehirns, Isolierung der Vesikel	4
	2. Inkubation und Trennung der Vesikel durch Mikrofiltration	4
	3. Auflösung der Membranen und Messung der Radioaktivität	6
	4. Eiweißbestimmung	6
	5. Auswertung der Radioaktivität	7
	6. Berechnung von Km und Vmax	8
	7. Bestimmung des Ki-Wertes	8
	8. Statistische Auswertung	9
C.	VERWENDETE SUBSTANZEN	10
D.	ERGEBNISSE	11
	1. Charakterisierung der verwendeten Vesikelfraktion	11
	2. Einfluß von Pargylin und Ascorbinsäure auf die Katecholaminaufnahme	11
	3. Die Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin	12
	4. Wirkung von (+)-Noradrenalin auf die ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme	15
	5. Die Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin	18
	6. Wirkung von (+)-Noradrenalin auf die ^{3}H-(-)-Noradrenalinaufnahme	21
	7. Bestimmung des Ki-Wertes von (+)-Noradrenalin	24
	8. Die Aufnahme von ^{14}C-(+)-Noradrenalin	24
	9. Die Wirkung von Amezinium metilsulfat auf die ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme	27
	10. Bestimmung des Ki-Wertes von Amezinium metilsulfat	30
E.	DISKUSSION	34
F.	ZUSAMMENFASSUNG	40
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		I - V

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0026

A. EINLEITUNG

Versuche mit isolierten, katecholaminspeichernden synaptischen Vesikeln der peripheren sympathischen Nerven (EULER und LISHAJKO, 1963a) und der Ganglien (PHILIPPU et al., 1967) zeigten, daß die Vesikel Noradrenalin aus dem Inkubationsmedium aufzunehmen vermögen. Auch in die Vesikel des Gehirns wird exogenes Noradrenalin aufgenommen (MAYNERT und KURIAMA, 1964; MIRKIN et al., 1964; PHILIPPU und BEYER, 1973).

KIRSHNER (1962) und CARLSSON et al. (1962, 1963) fanden, daß die Aufnahme von Katecholaminen in isolierte Vesikel des Rindernebennierenmarks durch Zugabe von ATP und Mg^{++} erhöht wird. Diese ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme ist temperaturabhängig und wird durch Reserpin gehemmt. Bald darauf wurde ein ähnlicher Mechanismus der Katecholaminakkumulation in isolierte Vesikel von Milznerven (EULER und LISHAJKO, 1963b, 1967, 1969) sowie in Vesikel verschiedener Regionen des Schweinegehirns (PHILIPPU et al., 1968; PHILIPPU et al., 1969; PHILIPPU und BEYER, 1973; PHILIPPU und MATTHAEI, 1975; LENTZEN und PHILIPPU, 1981), des Ganglion stellatum des Rindes (PHILIPPU et al., 1967) und des Rattenherzens (BAREIS und SLOTKIN, 1979) beschrieben. SEIDLER et al. (1977) und SLOTKIN et al. (1978a,b) untersuchten die Katecholaminakkumulation in Vesikeln des gesamten bzw. verschiedener Regionen des Rattengehirns. Der Aufnahmemechanismus von Katecholaminen in die Vesikel des Rattengehirns zeigte ähnliche Eigenschaften wie die Katecholaminaufnahme in Vesikel anderer Gewebe, nämlich Abhängigkeit von der Zugabe von ATP und Mg^{++}, Temperatur- und Sättigungsabhängigkeit sowie Hemmung der Aufnahme durch Reserpin (PHILIPPU und BEYER, 1973; SEIDLER et al., 1977; SLOTKIN et al., 1978a,b; BAREIS und SLOTKIN, 1979).

Bei der Untersuchung des Aufnahmemechanismus von Katecholaminen in Vesikel des peripheren Nervensystems stellte sich auch die Frage nach Stereospezifität. CARLSSON et al. (1963) wiesen darauf hin, daß die Aufnahme von Noradrenalin in die Versikel des Nebennierenmarks zwar nicht stereospezifisch ist, aber eine deutliche Bevorzugung für die Aufnahme von (-)-Noradrenalin zeigt. Bei niedrigen Konzentrationen des Amins im Inkubationsmedium ist die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von (-)-Noradrenalin in die Vesikel sympathischer Nervenendigungen höher als die Aufnahme von (+)-Noradrenalin (EULER und LISHAJKO, 1964). Das trifft auch für die Untersuchung von STJÄRNE und EULER (1965) zu, die bei niedrigen Konzentrationen von markiertem (±)-Noradrenalin im Inkubationsmedium und in Gegenwart hoher Konzentrationen von nicht markiertem (+)-, (-)- oder (±)-Noradrenalin eine Affinitätsrate (-) Noradrenalin/(+)-Noradrenalin von 5,9 fanden. Später teilten EULER und LISHAJKO (1967) eine noch höhere Affinitätsrate (9,4) für die Aufnahme in die Nervenvesikel mit.

TAUGNER (1972) stellte fest, daß in isolierten Membranen der Nebennierenmarksvesikel die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von (-)-Noradrenalin 15 - 20 % höher ist als die des (+)-Noradrenalins. In Abwesenheit von ATP und Mg^{++} konnte sie keine Stereospezifität feststellen. PHILLIPS (1974) fand, daß die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von (-)-Noradrenalin in chromaffine Vesikel viermal höher war als die des (+)-Isomers. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse ist jedoch fragwürdig, weil die Versuche in Gegenwart von Reserpin durchgeführt wurden.

BAREIS und SLOTKIN (1979) zeigten, daß die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von Noradrenalin in synaptische Vesikel, die aus dem Rattenherzen isoliert werden, völlig stereospezifisch ist, da die Aufnahme von markiertem (-)-Noradrenalin durch Zugabe von nicht markiertem (-)-Noradre-

nalin doppelt so stark gehemmt wird als durch nicht markiertes (±)-Noradrenalin. Die Aussagekraft dieser Befunde ist auch fragwürdig, da bei maximaler Stereospezifität der Quotient "Hemmung durch (-)-Noradrenalin/Hemmung durch (±)-Noradrenalin" 2, bei nicht vorhandener Stereospezifität 1 beträgt. Kleine Fehler und Ungenauigkeiten können also eine maximale Stereospezifität vortäuschen.

Nachdem eine Stereospezifität der Noradrenalinaufnahme in Vesikel des Nebennierenmarks, des Rattenherzens und der Milznervenendigungen beobachtet werden konnte, erhebt sich die Frage, ob dies auch für die synaptischen katecholaminspeichernden Vesikel des ZNS zutrifft. Zur Untersuchung der Stereospezifität habe ich Versuche mit (-)-, (±)- und (+)-Noradrenalin durchgeführt.

B. METHODE

1. Präparation und Homogenisierung des Rattengehirns, Isolierung der Vesikel

Um die Aufnahme von Katecholaminen in synaptische Vesikel des gesamten Rattengehirns zu untersuchen, wurde die 80.000 g Fraktion verwendet, die synaptische Vesikel enthält (PHILIPPU und BEYER, 1973). Das Gehirn frischgeschlachteter Ratten wurde freigelegt und in eine 15 ml 0,3 M Saccharoselösung gegeben, die in einem Eiswasserbad ($0^{o}C$) vorgekühlt war. Das Gehirn wurde mit einer Schere grob zerkleinert und mit einem Potter-Elvehjem S Homogenisator durch zweimalige manuelle Betätigung eines Kolbens, der mit 900 Umdrehungen pro min rotierte, homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine Lage Mull filtriert, um Gewebestücke abzutrennen. Nach Zugabe von 10 ml 0,3 M Saccharoselösung wurde das Homogenat in einer Christ II KS Kühlzentrifuge bei 600 g 15 min zentrifugiert, um die schwereren Gewebebestandteile, wie z.B. Zelldetritus, abzutrennen. Der Überstand wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge bei 20.000 g 30 min und der erhaltene Überstand 30 min bei 80.000 g zentrifugiert. Das Sediment (80.000 g Fraktion), das die synaptischen Vesikel enthält, wurde in eisgekühlten Puffer (Kaliumphosphatpuffer 0,13 M, pH 7,4) mit einer 2 ml Pipette suspendiert. Danach wurde etwa 1 ml Kaliumphosphatpuffer zugegeben, um eine gewünschte Eiweißkonzentration von 0,5 - 1,0 mg/ml zu erhalten.

2. Inkubation und Trennung der Vesikel durch Mikrofiltration

Inkubation und Trennung der inkubierten Vesikel mittels Membranfiltration wurden, ähnlich wie von LENTZEN und

PHILIPPU (1977) beschrieben, durchgeführt. Die Inkubationsansätze hatten ein Volumen von je 2,5 ml. Sie enthielten 0,2 ml Vesikelsuspension, 0,5 ml Magnesiumsulfatlösung ($MgSO_4$) (Endkonzentration 10^{-3} M), 0,1 ml Adenosintriphosphatlösung (ATP) (Endkonzentration 10^{-3} M), 0,1 ml einer Lösung, die radioaktiv markiertes (±)-, (-)- oder (+)-Noradrenalin enthielt, 0,1 ml Hemmstofflösung ((+)-Noradrenalin bzw. Amezinium metilsulfat) und Kaliumphosphatpuffer (0,13 M, pH 7,4). Bei Versuchen ohne $MgSO_4$ und ATP oder Hemmstoff wurde deren Volumen durch Kaliumphosphatpuffer ersetzt. $MgSO_4$ wurde in Wasser, die übrigen Substanzen in Kaliumphosphatpuffer gelöst.

I n k u b a t i o n s v o r g a n g :

Kaliumphosphatpuffer und Magnesiumsulfatlösung wurden in einem Glas im Wasserbad bei 25°C unter Schütteln (200/min) 5 min vorgewärmt. Danach wurde Vesikelsuspension und ATP gleichzeitig zugesetzt und bei 25°C 1 min lang vorinkubiert. Die Inkubation begann, indem die Lösung mit dem radioaktiv markierten (±)-, (-)- und (+)-Noradrenalin (und gegebenenfalls gleichzeitig Hemmstoff) zugegeben wurde. Die Inkubationsansätze wurden einmal bei einer bestimmten Konzentration von markiertem (±)-, (-)- oder (+)-Noradrenalin unterschiedlich lang und zum anderen bei verschiedenen Konzentrationen der radioaktiven Amine in einer bestimmten Zeitspanne inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Gläser aus dem Inkubationsbad in ein Eiswasser-Bad gestellt und mit 5 ml eiskaltem Kaliumphosphatpuffer versetzt. Im Kühlraum bei 4°C wurden von jedem Inkubationsansatz 5 ml in die Kammern eines Mikrofiltrationsgerätes (Amicon MMK) eingefüllt. Die Ansätze wurden unter Druck (Stickstoff; 3 Bar) durch Zellulosenitratmembranen (Sartorius Membranfilter No. 11359, Ø 25 mm, mittlere Porengröße 0,1 µm; LENTZEN und PHILIPPU (1977)) filtriert. Die Membranfilter waren zuvor 1 - 2 min in Kaliumphosphatpuffer getränkt worden.

Nach der Filtration wurden die Membranfilter noch zweimal durchgespült, indem jedesmal je 9 ml eiskalter Kaliumphosphatpuffer in die Kammern gefüllt und jeweils wieder unter Druck filtriert wurden. Der gesamte Filtrationsvorgang dauerte je nach Eiweißgehalt ca. 1 min. Danach wurden die Membranfilter aus der Apparatur genommen und ca. 60 min bei Raumtemperatur getrocknet.

3. Auflösung der Membranen und Messung der Radioaktivität

Die getrockneten Membranen wurden in Szintillationsfläschchen gegeben und zusammen mit je 0,5 ml 0,5 N HCl im Wasserbad bei 100°C 15 min lang erhitzt. Danach wurden die Fläschchen aus dem Wasserbad genommen und 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Je 1 ml Essigsäureäthylester wurde sofort, 10 ml Szintillationsmedium (5 g PPO, 0,1 g POPOP, 600 ml Toluol, 100 ml Äthanol, 300 ml Triton X-100, 20 ml 1 N HCl) nach 15 min zugegeben. Die Radioaktivität wurde im Betaszint 5 000 (Berthold) nach 15 min langer Vorkühlung bei 4°C gemessen. Vom Rest der Vesikelsuspension, der nicht inkubiert worden war, wurden 0,2 ml in 10 ml 0,5 N NaOH gelöst und die Eiweißkonzentration nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

Die Untersuchung auf eine mögliche Beschädigung der Vesikel bei der Filtration unterblieb, da LENTZEN und PHILIPPU (1977) feststellten, daß die Mikrofiltrationsmethode die Vesikel unwesentlich beschädigt.

4. Eiweißbestimmung

Bei der Bestimmung wird Eiweiß in einen Kupfereiweißkomplex überführt. Aromatische Aminosäuren, die in diesem Komplex vorliegen, reduzieren vermutlich die Phosphormolybdänsäure im Folin-Ciocalteus Reagenz zu Molybdänblau. Eiweiß wurde nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

0,2 ml Vesikelsuspension wurden in 10 ml 0,5 N NaOH 20 min unter Rühren im Wasserbad bei 50°C gelöst. Zu 1 ml der NaOH-Lösung wurden 5 ml eines frisch zubereiteten Gemisches (300 ml 2 %ige Natriumkarbonatlösung in 0,1 N NaOH und 6 ml 0,1 %ige Kaliumnatriumtartratlösung in 0,5 %iger Kupfer-II-Sulfatlösung) pipettiert. Nach 15 min wurden unter Schütteln 0,5 ml 1 N Folin-Ciocalteus Reagenz zugegeben. Die Extinktion wurde nach 55 min gegen einen Reagenzleerwert (H_2O) im Zeiss-Spektralphotometer bei 700 nm gemessen. Die Eiweißkonzentrationen wurden aus einer mit dem Eichstandard Lab-trol aufgestellten Eichkurve errechnet. Zur Kontrolle wurden bei jeder Bestimmung Standardlösungen (1 ml der Lösungen: 30 µg bzw. 50 µg Eiweiß/ml H_2O) mitgemessen.

5. Auswertung der Radioaktivität

Die Radioaktivität auf den in HCl und Essigsäureäthylester aufgelösten Zellulosenitratfiltern wurde in 10 ml des oben erwähnten Szintillationsgemisches in einem Betaszint BF 5 000 gemessen. Die Impulse/min (cpm) wurden in Zerfälle/min (dpm) umgerechnet, die jeweilige Zählausbeute einer Eichkurve entnommen.

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm} \cdot 100}{\text{Zählausbeute}}$$

Standardflüssigkeiten waren ^{14}C-Toluol ($4{,}15 \cdot 10^5$ dpm/ml) und ^{3}H-Toluol ($3{,}12 \cdot 10^6$ dpm/ml).

Die spezifische Aktivität (spez. Akt.) für (±)-^{3}H-Noradrenalin betrug 14,7 Ci/mMol, für (-)-^{3}H-Noradrenalin 25,4 Ci/mMol und für (+)-^{14}C-Noradrenalin 30 mCi/mMol.

Für den Zerfall von ^{3}H- oder ^{14}C-markierten Stoffen gilt:

1 nCi = 2220 dpm.

Die aufgenommene Menge des radioaktiven Stoffes wurde nach der folgenden Formel umgerechnet, wobei die Konzentrationen in pMol angegeben wurden:

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Zerfälle/min}}{2220 \cdot \text{spez. Aktivität}}$$

Bei den Versuchen, bei denen, um die gewünschten Konzentrationen zu erzielen, nicht markierte Anteile den markierten Stoffen zugesetzt waren, wurde die Konzentration der aufgenommenen Substanzen wie oben angegeben errechnet und mit folgendem Faktor (F) multipliziert:

$$F = \frac{\text{verwendete Gesamt-Substanzkonzentration}}{\text{Konzentration des markierten Anteils}}$$

Anschließend wurde die Aufnahme als pMol · mg Protein^{-1} berechnet. Bei dieser Berechnung wurde der Leerwert (Radioaktivität, die nur an Membranen gebunden ist) jeweils abgezogen.

6. Berechnung von Km und Vmax

Die Km- und Vmax-Werte wurden nach WILKINSON (1961) berechnet, wobei die experimentellen Daten mit Hilfe eines iterativen Verfahrens durch Minimalisierung der quadratischen Abweichung direkt an die Michaelis-Menten Funktion angepaßt wurden.

7. Bestimmung des Ki-Wertes

Der Ki-Wert wurde nach der Gleichung von HUNTER und DOWNS (1945) bestimmt.

$$I \cdot \frac{\alpha}{1 - \alpha} = Ki + \frac{K_i}{Km} \cdot S$$

I = Konzentration des Hemmstoffs
S = die angebotenen Substratkonzentrationen
Km = Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit erreicht wird
Ki = Hemmstoffkonstante
α = die in Gegenwart von Hemmstoff ((+)-Noradrenalin bzw. Amezinium metilsulfat) innerhalb eines definierten Zeitraumes $ATP\text{-}Mg^{++}$-abhängige $^{3}H\text{-}(\pm)$- bzw. $^{3}H\text{-}(-)$-Noradrenalinaufnahme dividiert durch die $ATP\text{-}Mg^{++}$-abhängige $^{3}H\text{-}(\pm)$- bzw. $^{3}H\text{-}(-)$-Noradrenalinaufnahme in Abwesenheit von Hemmstoff

8. Statistische Auswertung

Die Prüfung der arithmetischen Mittelwerte auf signifikante Unterschiede wurde mit dem t-Test von Student durchgeführt. Die Berechnungen sowie die Regressionsanalysen erfolgten nach konventionellen Methoden der Statistik.

C. VERWENDETE SUBSTANZEN

Folgende Substanzen wurden verwendet:

(+)-Noradrenalin Bitartrat (Sterling Winthrop); (±)-Noradrenalin Bitartrat, (-)-Noradrenalin Bitartrat (Serva Feinbiochemica, Heidelberg); Adenosin-5-triphosphat als Dinatriumsalz (Boehringer, Mannheim); (±)-(7-^{3}H(N))-Noradrenalin, spez. Akt.: 14,7 Ci/mMol, (-)-(7,8-^{3}H(N))-Noradrenalin, spez. Akt.: 25,4 Ci/mMol (NEN Chemical, Dreieichenhain); (+)-^{14}C-Noradrenalin, spez. Akt.: 30 mCi/mMol (Amersham Buchler); Amezinium metilsulfat (BASF, Ludwigshafen); Pargylinhydrochlorid (Abott, Chicago); Lab-trol (Dade, Miami).

D. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der verwendeten Vesikelfraktion

PHILIPPU und BEYER (1973) zeigten, daß die 80.000 g Fraktion des Nucleus caudatus vom Schwein nur leicht mit anderen subzellulären Partikeln wie Mitochondrien, Lysosomen und Mikrosomen kontaminiert ist, wie die Bestimmung des enzymatischen Profils dieser Fraktion ergab. Diese Vesikel des Nucleus caudatus nehmen Dopamin und Noradrenalin durch zwei verschiedene Mechanismen auf: Der eine ist ATP-Mg^{++}-unabhängig und funktioniert auch bei niedrigen Temperaturen, während der andere ATP-Mg^{++}- und temperaturabhängig sowie sättigungsfähig ist (PHILIPPU und BEYER, 1973).

In den folgenden Versuchen wurde die Aufnahme von (±)-, (-)- und (+)-Noradrenalin in die synaptischen Vesikel des gesamten Rattengehirns untersucht.

2. Einfluß von Pargylin und Ascorbinsäure auf die Katecholaminaufnahme

Orientierende Versuche mit Pargylin und Ascorbinsäure (sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von ATP und Mg^{++}) zeigten, daß die Katecholaminaufnahme durch diese beiden Substanzen bei einer Inkubationsdauer von 0,5 min bis 20 min nicht beeinflußt wurde. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf eine Zugabe von Pargylin (als Hemmer der MAO) und Ascorbinsäure (um Autooxidation der Katecholamine zu verhindern) ins Inkubationsmedium verzichtet.

3. Die Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin

Die Vesikelsuspension wurde bei 25°C mit ^{3}H-(±)-Noradrenalin inkubiert. In Abwesenheit von ATP und Mg^{++} erreichte die Akkumulation bereits nach 1 min ein "steady state" und blieb dann bis 20 min konstant (Abb. 1). Nach 20 min betrug die Akkumulation 1,6 pMol ^{3}H-(±)-Noradrenalin · mg Protein $^{-1}$. Inkubation in Gegenwart von ATP und Mg^{++} steigerte die Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin. Ein "steady state" der Akkumulation wurde nach 5 min erreicht (Akkumulation bei 20 min: 4,1 pMol ^{3}H-(±)-Noradrenalin · mg Protein $^{-1}$).

Die ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation (Delta-Akkumulation: d.h., daß die Akkumulation in Abwesenheit von ATP-Mg^{++} abgezogen wurde) verlief scheinbar linear bis zu 3 min und erreichte anschließend ein "steady state" (Akkumulation bei 20 min: 2,52 pMol ^{3}H-(±)-Noradrenalin · mg Protein $^{-1}$). Um festzustellen, ob eine lineare Beziehung zwischen Noradrenalinakkumulation und Zeit besteht, wurde die Delta-Akkumulation bis zu 2 min graphisch dargestellt (Abb. 2).

Um die transportkinetischen Parameter Km und Vmax sicher im zeitlich linearen Aufnahmebereich bestimmen zu können, wurde für die folgenden Versuche zur konzentrationsabhängigen ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme eine Inkubationszeit von 1 min gewählt. Die Vesikelsuspension mit 0,3, 1, 3, 6, 9 und 27 · 10^{-7} M ^{3}H-(±)-Noradrenalin wurde 1 min mit ATP und Mg^{++}, bei anderen Ansätzen ohne ATP und Mg^{++} inkubiert. Die konzentrationsabhängige Akkumulation von (±)-Noradrenalin in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} verlief bis zur verwendeten höchsten Konzentration linear. Bei Anwesenheit von ATP und Mg^{++} im Inkubationsmedium war die Akkumulation von (±)-Noradrenalin höher. Die ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation (Delta-Akkumulation) näherte sich bei Konzentrationen über 9 · 10^{-7} M ^{3}H-(±)-Noradrenalin

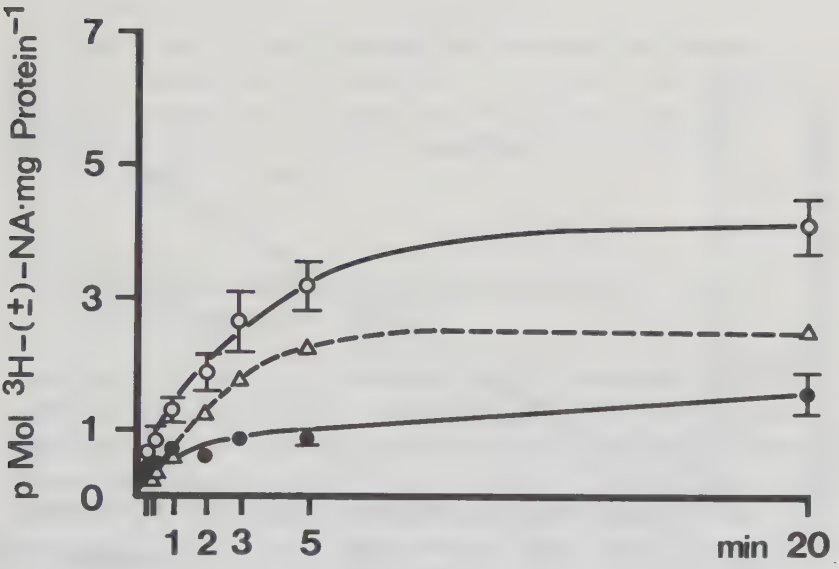

Abb. 1: Zeitabhängigkeit der ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme

Ordinate: Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1}. Abszisse: Zeit in min. Die synaptischen Vesikel wurden bei 25°C mit 10^{-7} M ^{3}H-(±)-Noradrenalin in Abwesenheit (schwarze Kreise) oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} (weiße Kreise) inkubiert. Weiße Dreiecke: Zeitabhängige, ATP-Mg^{++}-abhängige ^{3}H-(±)-Noradrenalinakkumulation (Deltaakkumulation), nach Abzug der ^{3}H-(±)-Noradrenalinakkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++}. Mittelwerte aus 5 - 8 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

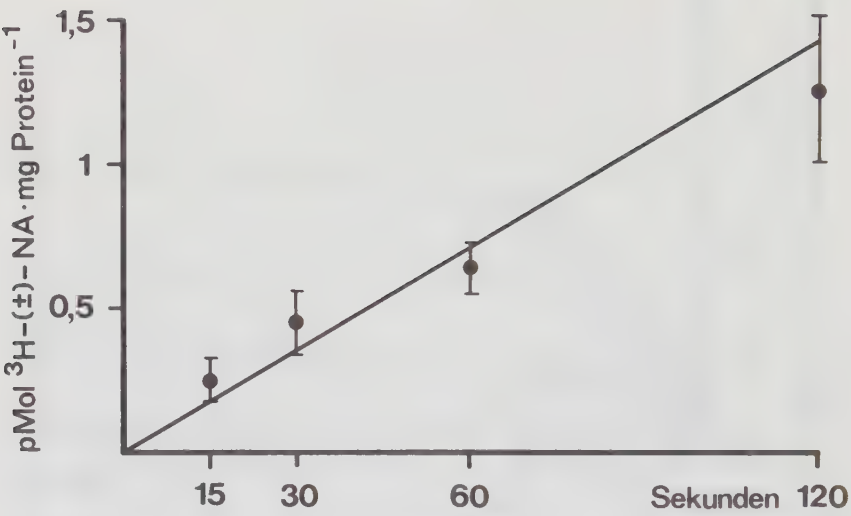

Abb. 2: Zeitabhängigkeit der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin

Ordinate: Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} in Gegenwart von ATP und Mg^{++} nach Abzug der Akkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++}. Abszisse: Zeit in s. Die synaptischen Vesikel wurden bei 25°C mit 10^{-7} M ^{3}H-(±)-Noradrenalin inkubiert. Mittelwerte aus 6 - 7 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

im Inkubationsmedium einem Sättigungszustand (Abb. 3). Die Daten der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation wurden nach WILKINSON (1961) berechnet. Der Km-Wert für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin betrug 14,9 ± 2,2 · 10^{-7} M, der Vmax-Wert 5,5 ± 0,4 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}.

4. Wirkung von (+)-Noradrenalin auf die ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme

Die Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in Gegenwart von ATP und Mg^{++} wurde durch (+)-Noradrenalin konzentrationsabhängig gehemmt. Die Werte der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation in Gegenwart oder in Abwesenheit von (+)-Noradrenalin wurden nach LINEWEAVER und BURK (1934) aufgetragen. Die zwei Regressionsgeraden schnitten sich auf der Ordinate (Abb. 4). Das bedeutet, daß die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in die Vesikel durch (+)-Noradrenalin kompetitiv gehemmt wurde.

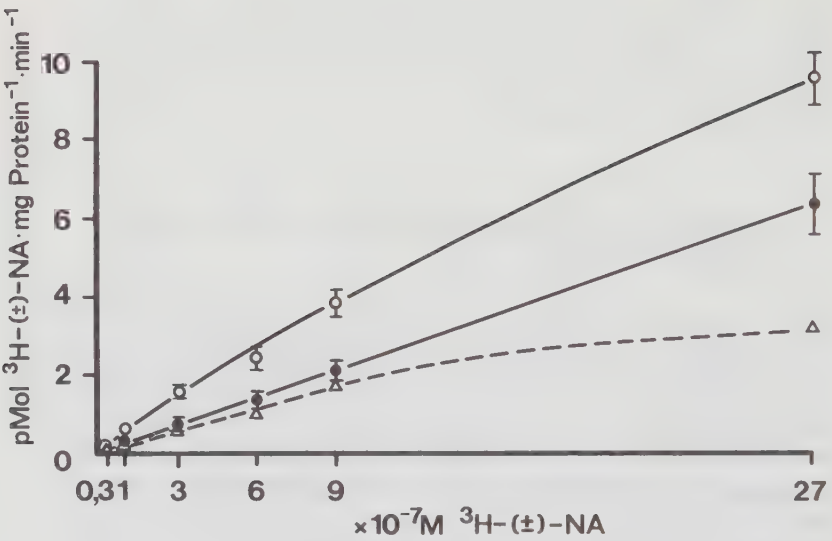

Abb. 3: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin

Ordinate: Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Abszisse: Konzentration von ^{3}H-(±)-Noradrenalin im Inkubationsmedium. Die Ansätze wurden in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} (schwarze Kreise) oder in ihrer Gegenwart (weiße Kreise) 1 min bei 25°C inkubiert. Die kinetischen Konstanten der ATP-Mg^{++}-abhängigen ^{3}H-(±)-Noradrenalinakkumulation (weiße Dreiecke) wurden nach WILKINSON (1961) berechnet. Km = 14,9 ± 2,2 · 10^{-7} M, Vmax = 5,5 ± 0,4 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Mittelwerte aus 7-10 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

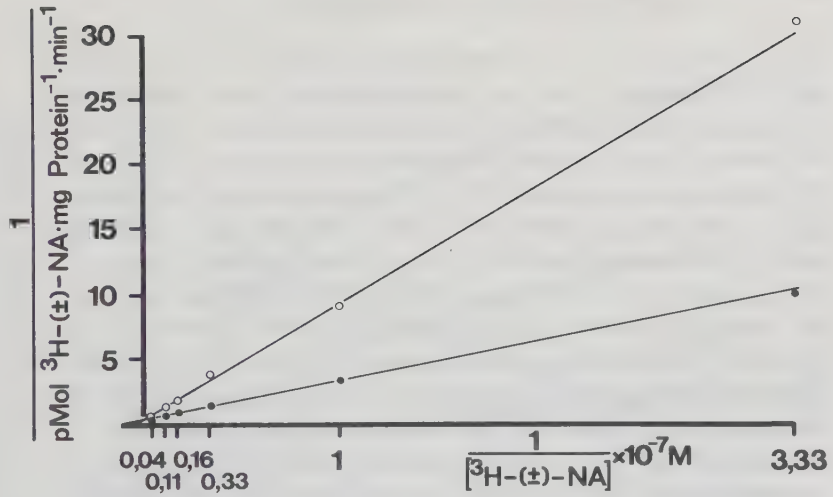

Abb. 4: ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in die synaptischen Vesikel in Abwesenheit und in Gegenwart von (+)-Noradrenalin

Ordinate: Reziproke Werte der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Abszisse: Reziproke Werte der ^{3}H-(±)-Noradrenalinkonzentration im Inkubationsmedium. Schwarze Kreise: ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in Abwesenheit von (+)-Noradrenalin. Weiße Kreise: ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M (+)-Noradrenalin. Die Ansätze wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} bei 25°C 1 min vorinkubiert und nach Zugabe von ^{3}H-(±)-Noradrenalin 1 min bei 25°C inkubiert. Einigen Ansätzen wurde gleichzeitig mit ^{3}H-(±)-Noradrenalin (+)-Noradrenalin zugegeben. Die Akkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} wurde von der Gesamtakkumulation abgezogen. Die Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) zeigt eine kompetitive Hemmung der ATP-Mg^{++}-abhängigen ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme durch (+)-Noradrenalin. Mittelwerte von 6 Versuchen.

5. Die Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin

Die Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin wurde in den folgenden Versuchen wie bei den Versuchen mit ^{3}H-(±)-Noradrenalin untersucht und kinetisch analysiert. Auch bei diesen Versuchen betrug die Substratkonzentration 10^{-7} M. Die Vesikelsuspension wurde bei 25°C unterschiedlich lange (15 s bis 20 min) inkubiert. Ohne ATP und Mg^{++} kam es zu einer zeitabhängigen ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation, die nach 1 min ein "steady state" erreichte und bis zur 20. min (Akkumulation: 2,3 pMol ^{3}H-(-)-Noradrenalin · mg Protein^{-1}) annähernd konstant blieb (Abb. 5). In Gegenwart von ATP und Mg^{++} stieg die Akkumulation von ^{3}H-(-)-Noradrenalin stärker an und erreichte nach 5 min ein "steady state". Sie betrug nach 20 min 7,2 pMol ^{3}H-(-)-Noradrenalin · mg Protein^{-1}. Verglichen mit der ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme war nach Erreichen des "steady state" die Akkumulation von ^{3}H-(-)-Noradrenalin stets höher als die Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin.

Die ATP-Mg^{++}-abhängige ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation (Delta-Akkumulation) verlief bis zu 3 min scheinbar linear und erreichte anschließend ein "steady state", das höher war als bei der Delta-Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin (Akkumulation bei 20 min: 4,6 pMol ^{3}H-(-)-Noradrenalin · mg Protein^{-1}). Die Delta-Akkumulation von ^{3}H-(-)- Noradrenalin wurde wie die Delta-Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin bis 2 min graphisch dargestellt (Abb. 6). Es zeigte sich auch hier ein linearer Verlauf.

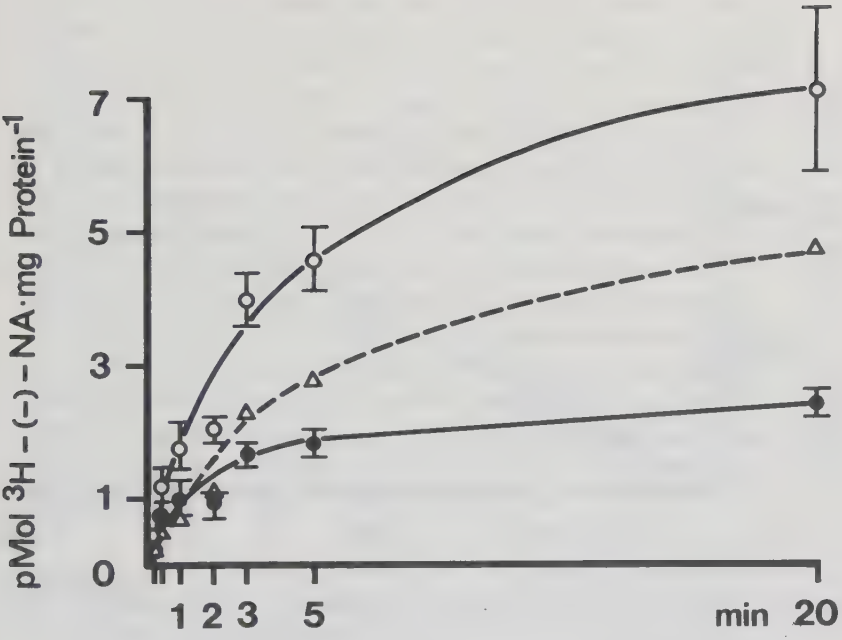

Abb. 5: Zeitabhängigkeit der ^{3}H-(-)-Noradrenalinaufnahme

Ordinate: Akkumulation von ^{3}H-(-)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1}. Abszisse: Zeit in min. Die synaptischen Vesikel wurden bei 25°C mit 10^{-7} M ^{3}H-(-)-Noradrenalin in Abwesenheit (schwarze Kreise) oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} (weiße Kreise) inkubiert. Weiße Dreiecke: Zeitabhängige, ATP-Mg^{++}-abhängige ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation (Delta-Akkumulation), nach Abzug der ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++}. Mittelwerte aus 3 - 9 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

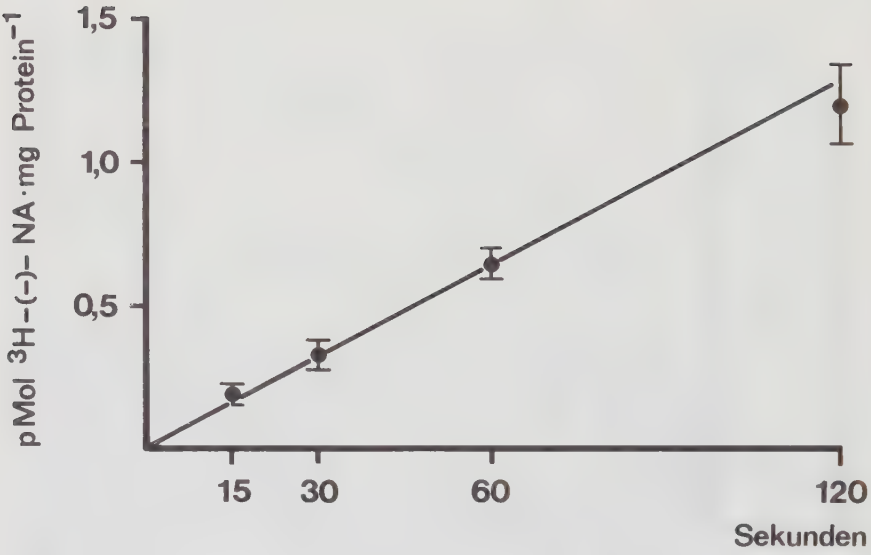

Abb. 6: Zeitabhängigkeit der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin

Ordinate: Akkumulation von ^{3}H-(-)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} in Gegenwart von ATP und Mg^{++} nach Abzug der Akkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++}. Abszisse: Zeit in s. Die synaptischen Vesikel wurden bei 25°C mit 10^{-7} M ^{3}H-(-)-Noradrenalin inkubiert. Mittelwerte aus 6 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

Um die konzentrationsabhängige ^{3}H-(-)-Noradrenalinaufnahme zu untersuchen, wurden die Vesikel mit 0,3, 1, 3, 9 bzw. 27 · 10^{-7} M ^{3}H-(-)-Noradrenalin jeweils 1 min lang mit bzw. ohne ATP und Mg^{++} inkubiert. Ohne ATP und Mg^{++} kam es zu einer annähernd linear ansteigenden, konzentrationsabhängigen Akkumulation. Zugabe von ATP und Mg^{++} ins Inkubationsmedium steigerte bei allen verwendeten Konzentrationen die ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation (Abb. 7). Die ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation (Delta-Akkumulation) näherte sich bei der Konzentration über 9 · 10^{-7} M - (-)-Noradrenalin einem Sättigungszustand. Die Daten der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation wurden nach WILKINSON (1961) berechnet. Der Km-Wert für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin betrug 7,7 ± 0,5 · 10^{-7} M und der Vmax-Wert 4,9 ± 0,1 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}.

6. Wirkung von (+)-Noradrenalin auf die ^{3}H-(-)-Noradrenalinaufnahme

Den Ansätzen mit unterschiedlichen ^{3}H-(-)-Noradrenalinkonzentrationen wurde (+)-Noradrenalin zugesetzt. Die Auftragung der Werte nach LINEWEAVER und BURK (1934) zeigte, daß die Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin in die Vesikel durch (+)-Noradrenalin kompetitiv gehemmt wurde (Abb. 8).

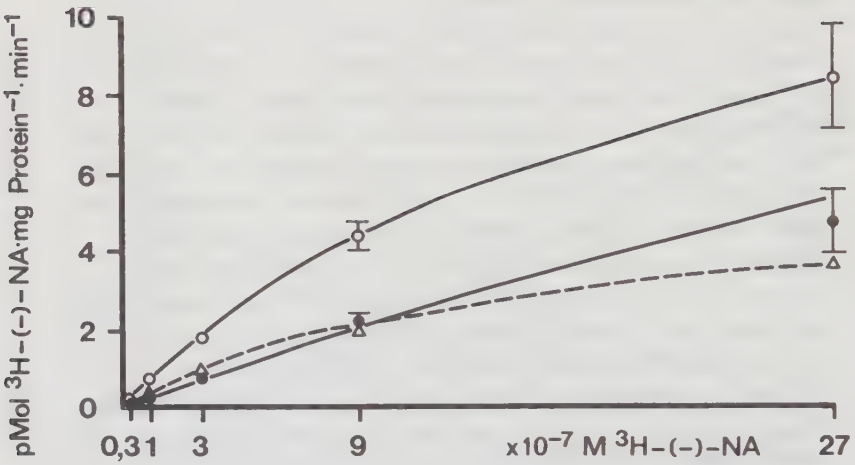

Abb. 7: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin

Ordinate: Akkumulation von ^{3}H-(-)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Abszisse: Konzentration von ^{3}H-(-)-Noradrenalin im Inkubationsmedium. Die Ansätze wurden in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} (schwarze Kreise) oder in ihrer Gegenwart (weiße Kreise) 1 min bei 25°C inkubiert. Die kinetischen Konstanten der ATP-Mg^{++}-abhängigen ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation (weiße Dreiecke) wurden nach dem Verfahren von WILKINSON (1961) berechnet. Km = 7,7 ± 0,5 M, Vmax = 4,9 ± 0,1 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Mittelwerte aus 9 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

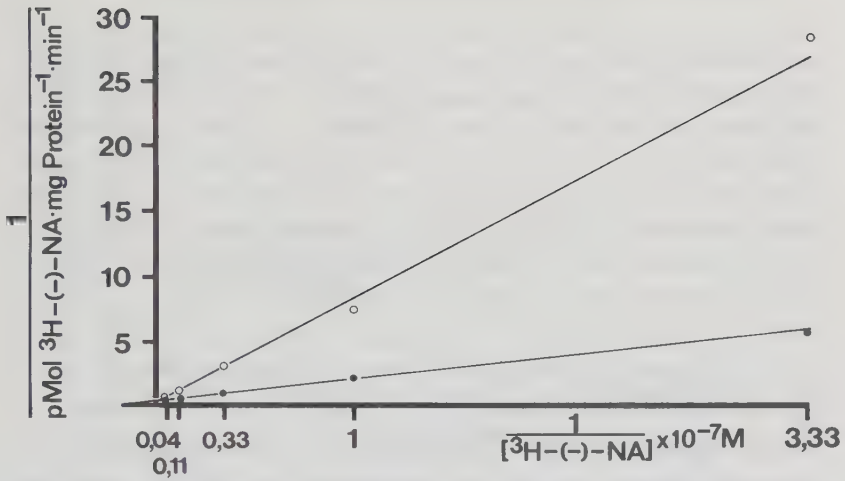

Abb. 8: ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin in die synaptischen Vesikel in Abwesenheit und in Gegenwart von (+)-Noradrenalin

Ordinate: Reziproke Werte der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation von ^{3}H-(-)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Abszisse: Reziproke Werte der ^{3}H-(-)-Noradrenalinkonzentration im Inkubationsmedium. Schwarze Kreise: ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in Abwesenheit von (+)-Noradrenalin. Weiße Kreise: ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in Gegenwart von 10^{-5} M (+)-Noradrenalin. Die Ansätze wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} bei 25°C 1 min vorinkubiert und nach Zugabe von ^{3}H-(-)-Noradrenalin 1 min bei 25°C inkubiert. Einigen Ansätzen wurde gleichzeitig mit ^{3}H-(-)-Noradrenalin (+)-Noradrenalin zugegeben. Die Akkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} wurde von der Gesamtakkumulation abgezogen. Die Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) zeigte eine kompetitive Hemmung der ATP-Mg^{++}-abhängigen ^{3}H-(-)-Noradrenalinaufnahme durch (+)-Noradrenalin. Mittelwerte von 4 - 6 Versuchen.

7. Bestimmung des Ki-Wertes von (+)-Noradrenalin

Für die Berechnung des Ki-Wertes wurden die unter D.3, D.4, D.5 und D.6 ermittelten Werte (Abb. 4 und 8) nach HUNTER und DOWNS (1945) aufgetragen (Abb. 9). Der Ki-Wert für (+)-Noradrenalin betrug bei den Versuchen mit ^{3}H-(±)-Noradrenalin 19,2 ± 1,0 · 10^{-7} M, bei den Versuchen mit ^{3}H-(-)-Noradrenalin lag er bei 17,7 ± 1,8 · 10^{-7} M. Er war also bei den Versuchen mit 3 · 10^{-6} M (+)-Noradrenalin (Agonist ^{3}H-(±)-Noradrenalin) und mit 10^{-5} M (+)-Noradrenalin (Agonist ^{3}H-(-)-Noradrenalin) praktisch identisch.

8. Die Aufnahme von ^{14}C-(+)-Noradrenalin

Die Aufnahme von ^{14}C-(+)-Noradrenalin in die synaptischen Versikel wurde, wie bei den Versuchen mit ^{3}H-(±)- und ^{3}H-(-)-Noradrenalin, untersucht und kinetisch analysiert. Aufgrund der niedrigen spezifischen Aktivität von ^{14}C-(+)-Noradrenalin wurde eine Substratkonzentration von 9 · 10^{-7} M im Inkubationsmedium (anstatt von 10^{-7} M wie bei den Versuchen mit ^{3}H-(±)- und ^{3}H-(-)-Noradrenalin) verwendet. Die Vesikelsuspension wurde mit bzw. ohne ATP und Mg^{++} bei 25°C über einen Zeitraum von 15 s bis 20 min inkubiert. Bei der Inkubation der Vesikelsuspension ohne ATP und Mg^{++} kam es zu einer zeitabhängigen Akkumulation, die nach 1 min ein "steady state" erreichte und bis zu 20 min annähernd konstant blieb (Akkumulation bei 20 min 22,3 pMol ^{14}C-(+)-Noradrenalin · mg Protein^{-1}) (Abb. 10). In Gegenwart von ATP und Mg^{++} stieg die Akkumulation von ^{14}C-(+)-Noradrenalin stärker an und erreichte nach 5 min ein "steady state". Nach 20 min betrug sie 38,4 pMol ^{14}C-(+)-Noradrenalin · mg Protein^{-1}.

Die ATP-Mg^{++}-abhängige ^{14}C-(+)-Noradrenalinakkumulation (Delta-Akkumulation) verlief bis zu 5 min linear und erreichte dann ein "steady state". Sie blieb bis 20 min annähernd konstant. Zu diesem Zeitpunkt betrug sie 16,1 pMol ^{14}C-(+)-Noradrenalin · mg Protein^{-1}.

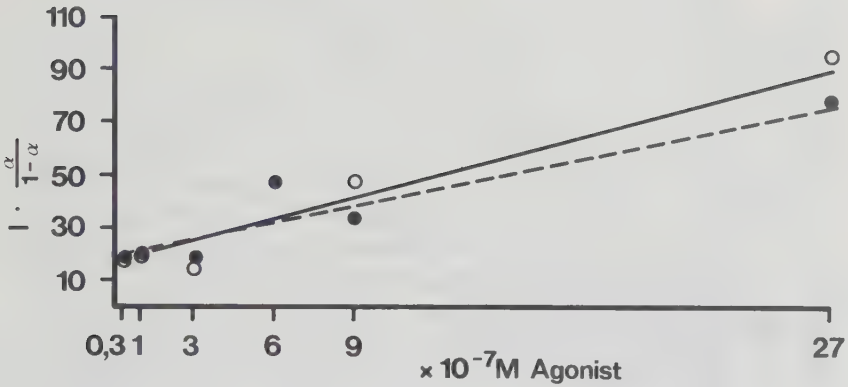

Abb. 9: Ki-Werte von (+)-Noradrenalin für die Hemmung der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von ^{3}H-(±)- und ^{3}H-(-)-Noradrenalin

Ordinate: $I \cdot \frac{\alpha}{1-\alpha}$. Abszisse: Konzentration von ^{3}H-(±)- bzw. ^{3}H-(-)-Noradrenalin im Inkubationsmedium. Schwarze Kreise: ^{3}H-(±)-Noradrenalinakkumulation in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M (+)-Noradrenalin. Weiße Kreise: ^{3}H-(-)-Noradrenalinakkumulation in Gegenwart von 10^{-5} M (+)-Noradrenalin. Die Mittelwerte stammen aus den unter D.3, D.4, D.5 und D.6 ermittelten Ergebnissen (Abb. 4 und 8). Für die Berechnung der Ki-Werte wurden die einzelnen Werte nach HUNTER und DOWNS (1945) aufgetragen. Ki-Wert von (+)-Noradrenalin (Agonist ^{3}H-(±)-Noradrenalin) = $19,2 \pm 1,0 \cdot 10^{-7}$ M. Ki-Wert von (+)-Noradrenalin (Agonist ^{3}H-(-)-Noradrenalin) = $17,7 \pm 1,8 \cdot 10^{-7}$ M.

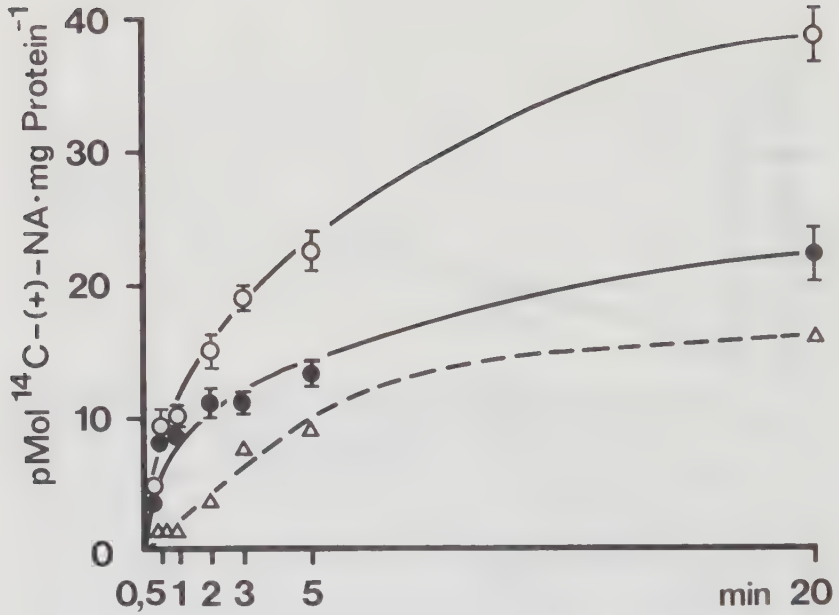

Abb. 10: Zeitabhängigkeit der ^{14}C-(+)-Noradrenalin-aufnahme

Ordinate: Akkumulation von ^{14}C-(+)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1}. Abszisse: Zeit in min. Die synaptischen Vesikel wurden bei 25°C mit 9 · 10^{-7} M ^{14}C-(+)-Noradrenalin in Abwesenheit (schwarze Kreise) oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} (weiße Kreise) inkubiert. Weiße Dreiecke: Zeitabhängige, ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation von ^{14}C-(+)-Noradrenalin (Delta-Akkumulation), nach Abzug der ^{14}C-(+)-Noradrenalinakkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++}. Mittelwerte aus 5 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte. (Bei 0,25 min jedoch nur 1 Versuch.)

Wegen der erwähnten niedrigen spezifischen Aktivität von ^{14}C-(+)-Noradrenalin wurde für die Untersuchung der konzentrationsabhängigen Aufnahme eine längere Inkubationszeit und eine höhere Substratkonzentration gewählt (3, 9, 27 und 81 · 10^{-7} M ^{14}C-(+)-Noradrenalin). Da die Aufnahme bis zu 5 min linear verlief, wurden die Vesikel 2 min lang sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} inkubiert. Auf der graphischen Darstellung wurden die Versuchswerte auf 1 min Inkubationszeit umgerechnet, um den Vergleich mit den vorhergehenden Versuchen zu erleichtern. Die konzentrationsabhängige Akkumulation ohne ATP und Mg^{++} verlief bis zur verwendeten höchsten Konzentration linear. Verglichen mit der konzentrationsabhängigen Akkumulation ohne ATP und Mg^{++} bei ^{3}H-(±)- und ^{3}H-(-)-Noradrenalin war die Akkumulation von ^{14}C-(+)-Noradrenalin um etwa den Faktor 3 höher. Anwesenheit von ATP und Mg^{++} im Inkubationsmedium steigerte die konzentrationsabhängige Akkumulation. Die ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation (Delta-Akkumulation) näherte sich bei Konzentrationen über 9 · 10^{-7} M ^{14}C-(+)-Noradrenalin im Inkubationsmedium einem Sättigungszustand (Abb. 11). Die kinetischen Parameter der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation wurden nach WILKINSON (1961) berechnet. Der Km-Wert für die ATP-Mg^{++}-abhängige ^{14}C-(+)-Noradrenalinaufnahme betrug 17,3 ± 3,7 · 10^{-7} M, der Vmax-Wert 5,1 ± 0,4 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}.

Eine Übersicht der Werte der kinetischen Analyse bietet Tabelle 1.

9. Die Wirkung von Amezinium metilsulfat auf die ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluß von Amezinium metilsulfat, einem neuen indirekten Sympathomimetikum (LENKE et al., 1979), auf die ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme

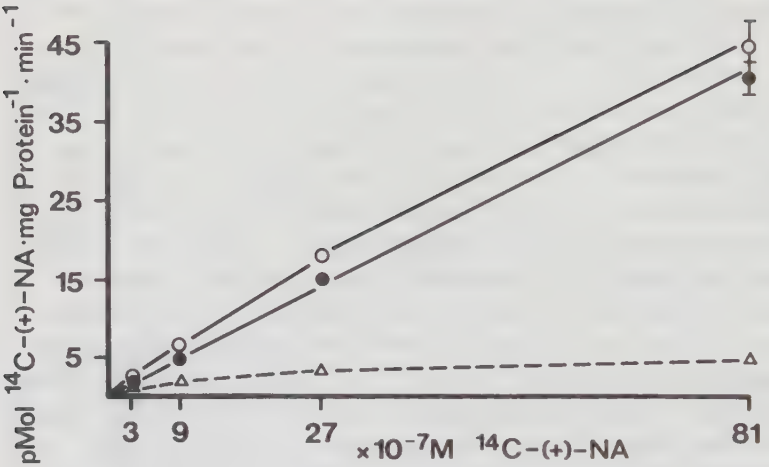

Abb. 11: Konzentrationsabhängige ^{14}C-(+)-Noradrenalinaufnahme

Ordinate: Akkumulation von ^{14}C-(+)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1}. Abszisse: Konzentration von ^{14}C-(+)-Noradrenalin im Inkubationsmedium. Die Ansätze wurden in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} (schwarze Kreise) oder in ihrer Gegenwart (weiße Kreise) 2 min lang bei 25°C inkubiert. Die kinetischen Konstanten der ATP-Mg^{++}-abhängigen ^{14}C-(+)-Noradrenalinakkumulation (weiße Dreiecke) wurden nach WILKINSON (1961) berechnet. Km = 17,3 ± 3,7 · 10^{-7} M. Vmax = 5,1 + 0,4 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Mittelwerte aus 6 - 9 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

Tab. 1: Km- und Vmax-Werte für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-, ^{3}H-(-)- und ^{14}C-(+)-Noradrenalin

	n	Km $\cdot 10^{-7}$ M	Vmax pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}
^{3}H-(-)-N A	(6)	7,7 ± 0,5	4,9 ± 0,1
^{3}H-(±)-N A	(6)	14,9 ± 2,2	5,5 ± 0,4
^{14}C-(+)-N A	(6-9)	17,3 ± 3,7	5,1 ± 0,4

Km- und Vmax-Werte wurden nach WILKINSON (1961) berechnet. Die Km-Werte für (±)- und (+)-Noradrenalin unterscheiden sich vom Km-Wert für (-)-Noradrenalin statistisch signifikant ($p < 0,05$).

in die synaptischen Vesikel des gesamten Rattengehirns untersucht.

Die Vesikelsuspension wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} bei 25°C 1 min vorinkubiert, anschließend wurde den Ansätzen $5 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M oder $5 \cdot 10^{-7}$ M Amezinium metilsulfat zugesetzt und eine weitere min vorinkubiert. Die Inkubation begann, indem ^{3}H-(±)-Noradrenalin zugegeben wurde. Die Inkubation dauerte 5 min.

Die Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} wurde durch Amezinium metilsulfat nicht beeinflußt. Die Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in Anwesenheit von ATP und Mg^{++} wurde durch Amezinium metilsulfat bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M deutlich gehemmt (Abb. 12). Um die Art der Hemmung festzustellen, wurde die Vesikelsuspension mit verschiedenen Konzentrationen von ^{3}H-(±)-Noradrenalin (0,3, 1, 3, 6, 9 oder $27 \cdot 10^{-7}$ M) und einige Ansätze gleichzeitig mit Amezinium metilsulfat (10^{-5} M) in Gegenwart von ATP und Mg^{++} 1 min inkubiert. Auftragung der Werte nach LINEWEAVER und BURK (1934) (Abb. 13) ergab, daß Amezinium metilsulfat die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in die synaptischen Vesikel kompetitiv hemmte.

10. Bestimmung des Ki-Wertes von Amezinium metilsulfat

Der Ki-Wert von Amezinium metilsulfat für die Hemmung der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin wurde anhand der in D.9 ermittelten Werte bestimmt (Abb. 13). Für die Berechnung des Ki-Wertes wurden diese Werte nach HUNTER und DOWNS (1945) aufgetragen (Abb. 14). Der Ki-Wert von Amezinium metilsulfat betrug $57,7 \pm 1,9 \cdot 10^{-7}$ M.

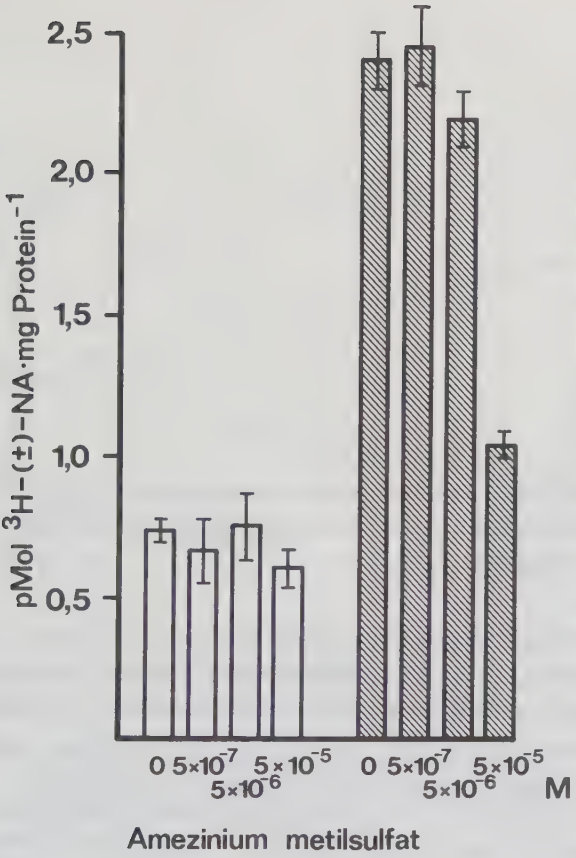

Abb. 12: Einfluß von Amezinium metilsulfat auf die ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme

Die Höhe der Säulen gibt die Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} an, die Ziffern unter den Säulen die Amezinium metilsulfat - Konzentration im Inkubationsmedium. Nach Vorinkubation der Vesikelsuspension bei 25°C über 1 min wurden die Ansätze mit verschiedenen Amezinium metilsulfat - Konzentrationen 1 weitere min vorinkubiert und anschließend mit 10^{-7} M ^{3}H-(±)-Noradrenalin in Abwesenheit (weiße Säulen) oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} (schraffierte Säulen) 5 min bei 25°C inkubiert. Mittelwerte aus 3 Versuchen und mittlere Fehler der Mittelwerte.

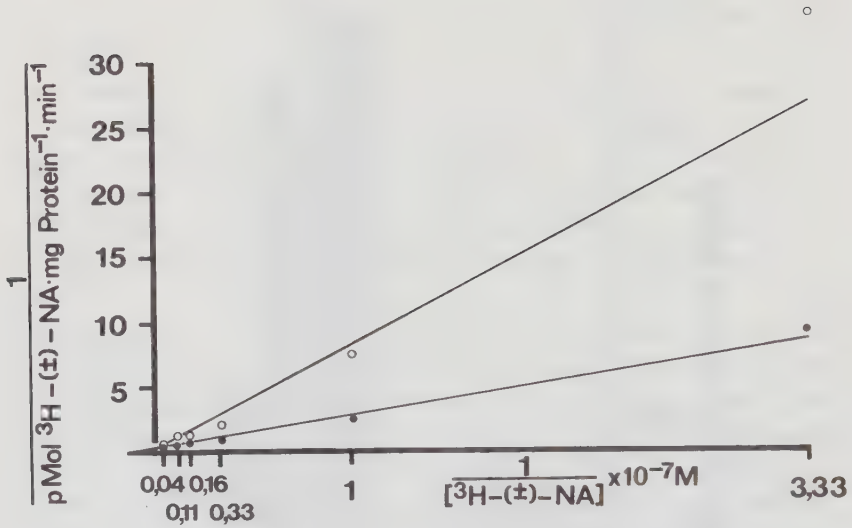

Abb. 13: ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in die synaptischen Vesikel in Abwesenheit und in Gegenwart von Amezinium metilsulfat

Ordinate: Reziproke Werte der ATP-Mg^{++}-abhängigen Akkumulation von ^{3}H-(±)-Noradrenalin in pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Abszisse: Reziproke Werte der ^{3}H-(±)-Noradrenalinkonzentration im Inkubationsmedium. Schwarze Kreise: ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in Abwesenheit von Amezinium metilsulfat. Weiße Kreise: ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in Gegenwart von 10^{-5} M Amezinium metilsulfat. Die Ansätze wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von ATP und Mg^{++} bei 25°C 1 min vorinkubiert und nach Zugabe von ^{3}H-(±)-Noradrenalin 1 min bei 25°C inkubiert. Einigen Ansätzen wurde gleichzeitig mit ^{3}H-(±)-Noradrenalin Amezinium metilsulfat zugegeben. Die Akkumulation in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} wurde von der Gesamtakkumulation abgezogen. Die Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) zeigte eine kompetitive Hemmung der ATP-Mg^{++}-abhängigen ^{3}H-(±)-Noradrenalinaufnahme durch Amezinium metilsulfat. Mittelwerte von 4 Versuchen.

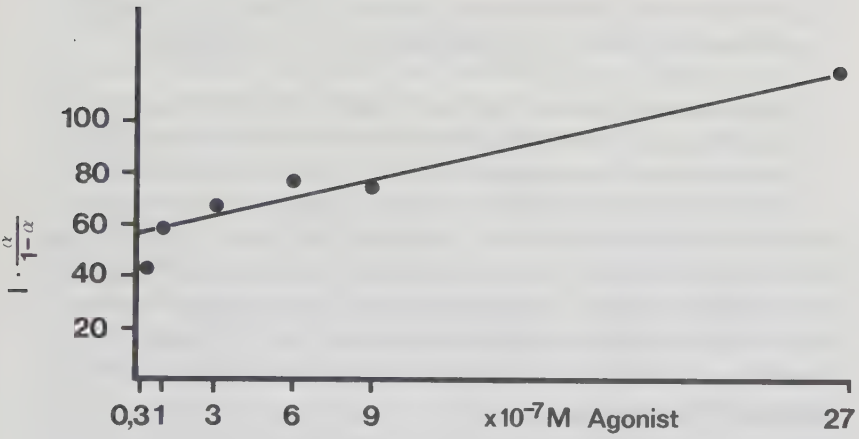

Abb. 14: Ki-Wert von Amezinium metilsulfat für die Hemmung der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von ^{3}H-(±)-Noradrenalin

Ordinate: $I \cdot \frac{\alpha}{1 - \alpha}$. Abszisse: Konzentration von ^{3}H-(±)-Noradrenalin im Inkubationsmedium. Die Mittelwerte stammen aus den unter D.9 ermittelten Ergebnissen (Abb. 13). Für die Berechnung des Ki-Wertes wurden die einzelnen Werte nach HUNTER und DOWNS (1945) aufgetragen. Ki-Wert von Amezinium metilsulfat (Agonist ^{3}H-(±)-Noradrenalin) = 57,7 ± 1,7 · 10^{-7} M.

E. DISKUSSION

Aufnahme in die synaptischen Vesikel von verschiedenen Noradrenalinisomeren in Abwesenheit von ATP und Mg^{++}

In Abwesenheit von ATP und Mg^{++} verlief die Aufnahme von (-)-, (±)- und (+)-Noradrenalin in die synaptischen Vesikel über einen breiten Konzentrationsbereich direkt proportional zu den angebotenen Konzentrationen des Amins im Inkubationsmedium. Auch DA PRADA et al. (1975) und LENTZEN und PHILIPPU (1981) konnten bei der Untersuchung der Noradrenalinaufnahme in Abwesenheit von ATP und Mg^{++} in isolierte Membranen des Nebennierenmarks bzw. in synaptische Vesikel des Nucleus caudatus des Schweines keine Sättigung feststellen.

Unterschiede zwischen der ATP-Mg^{++}-unabhängigen Aufnahme von ^{3}H-(-)-Noradrenalin und dem ^{3}H-Racemat ließen sich in dieser Arbeit, wie auch schon in der früheren Untersuchung von LENTZEN und PHILIPPU (1981) im Nucleus caudatus des Schweines, nicht zeigen. Ebensowenig ließ sich bei der Aufnahme von Noradrenalin in chromaffine Vesikel eine Stereospezifität der ATP-Mg^{++}-unabhängigen Aufnahme beobachten (TAUGNER, 1972). In der jetzigen Untersuchung wurde jedoch bei den Versuchen mit ^{14}C-(+)-Noradrenalin eine dreimal höhere Akkumulation festgestellt als bei den Versuchen mit ^{3}H-(-)-Noradrenalin bzw. ^{3}H-(±)-Noradrenalin. Der Grund für die unterschiedliche, ATP-Mg^{++}-unabhängige Akkumulation der verschiedenen Stereoisomeren des Noradrenalin in die Vesikel wurde nicht näher untersucht.

Aufnahme in die synaptischen Vesikel von verschiedenen Noradrenalinisomeren in Gegenwart von ATP und Mg^{++}

ATP und Mg^{++} steigerten die Aufnahmerate von Noradrenalin in die synaptischen Vesikel des Rattengehirns. Dies ent-

spricht den Befunden von SEIDLER et al. (1977), die die Aufnahme von Noradrenalin in synaptische Vesikel des Rattengehirns untersuchten. Auch in den Versuchen mit synaptischen Vesikeln des Nucleus caudatus des Schweines (PHILIPPU und BEYER, 1973; LENTZEN und PHILIPPU, 1981) sowie mit synaptischen Vesikeln des Nervensystems (EULER und LISHAJKO, 1963b; LUNDBORG und STITZEL, 1967) wurde ein ATP-Mg^{++}-abhängiger Aufnahmeprozeß beschrieben. ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation in die Vesikel des Gehirns war bei höheren Konzentrationen auch sättigungsfähig (PHILIPPU und BEYER, 1973; SEIDLER et al., 1977; LENTZEN und PHILIPPU, 1981). Auch für die Akkumulation in isolierte Membranen des Nebennierenmarks (DA PRADA et al., 1975) und in synaptische Vesikel des Rattenherzens (BAREIS und SLOTKIN, 1979) wurde eine Sättigung beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit verlief die ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation von ^{3}H-(±)- und ^{3}H-(-)-Noradrenalin bis 3 min linear und erreichte anschließend ein "steady-state", wogegen die ATP-Mg^{++}-abhängige Akkumulation von ^{14}C(+)-Noradrenalin bis 5 min linear verlief und erst danach ein "steady-state" erreichte. Dies ist wahrscheinlich auf eine geringere Affinität des (+)-Noradrenalin zum Transportsystem zurückzuführen. Die Untersuchung der Aufnahme bei einem breiten Konzentrationsbereich von Noradrenalin im Inkubationsmedium innerhalb des linearen Bereichs der zeitabhängigen Aufnahme ergab, daß am Anfang die Akkumulation linear verlief. Anschließend erreichte die Akkumulation von ^{3}H-(±)-, ^{3}H-(-)- und ^{14}C-(+)-Noradrenalin eine Sättigung. Für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme fand ich für (-)-Noradrenalin einen Km-Wert von $7{,}7 \pm 0{,}5 \cdot 10^{-7}$ M und einen Vmax-Wert von $4{,}9 \pm 0{,}1$ pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1}. Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen von SEIDLER et al. (1977) überein. In ihrer Untersuchung erreichte die Akkumulation eine Sättigung und hatte einen Km-Wert von $4 \cdot 10^{-7}$ M. Ebenso haben SLOTKIN et al. (1978b) bei der Untersuchung der ATP-Mg^{++}-abhängigen (-)-Noradrenalinaufnahme in synaptische Ve-

sikel verschiedener Regionen des Rattengehirns einen Km-Wert erhalten, der sich nicht statistisch signifikant unterschied ($4{,}1 \cdot 10^{-7}$ M im Corpus striatum; $4{,}9 \cdot 10^{-7}$ M im Hirnstamm und Kleinhirn; $5{,}4 \cdot 10^{-7}$ M in der Hirnrinde). Der Ki-Wert von (-)-Noradrenalin für die ATP-Mg^{++}-abhängige Dopaminaufnahme in Vesikel des Rattengehirns ist $6{,}9 \cdot 10^{-7}$ M (SLOTKIN et al., 1978c). Diese Km-Werte sind jedoch niedriger als die Km-Werte, die für den Nucleus caudatus des Schweines (PHILIPPU und BEYER, 1973: $34 \cdot 10^{-7}$ M; LENTZEN und PHILIPPU, 1981: $17{,}2 \cdot 10^{-7}$ M) und das Rattenherz (BAREIS und SLOTKIN, 1979: $20 \cdot 10^{-7}$ M) beschrieben wurden. Obgleich die Eigenschaften der Vesikel des Rattengehirns (SEIDLER et al., 1977; SLOTKIN et al., 1978a) denjenigen der Vesikel des Schweinestriatums (PHILIPPU und BEYER, 1973; LENTZEN und PHILIPPU, 1981) ähnlich sind, gibt es wahrscheinlich Unterschiede zwischen den Affinitäten der synaptischen Vesikel peripherer Organe und jenen des Gehirns sowie Speziesunterschiede, auf die die unterschiedlichen Km-Werte möglicherweise zurückzuführen sind. Schließlich kann auch die Methode der Präparation der Vesikel eine Rolle spielen, wie z.B. die Dauer der Zentrifugationsverfahren, die Puffer usw.

Für (±)-Noradrenalin erhielt ich nach dem gleichen Verfahren einen Km-Wert von $14{,}9 \pm 2{,}2 \cdot 10^{-7}$ M und einen Vmax-Wert von $5{,}5 \pm 0{,}4$ pMol $\cdot$ mg Protein$^{-1} \cdot$ min^{-1}.

Inkubation der Vesikel mit (+)-Noradrenalin hemmte kompetitiv die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von markiertem (±)- und (-)-Noradrenalin in die Vesikel. Der Ki-Wert von (+)-Noradrenalin bei den Versuchen mit ^{3}H-(±)-Noradrenalin ($19{,}2 \pm 1{,}0 \cdot 10^{-7}$ M) war sehr ähnlich mit demjenigen bei den Versuchen mit ^{3}H-(-)-Noradrenalin ($17{,}7 \pm 1{,}8 \cdot 10^{-7}$ M).

Auch bei den Inkubationsversuchen mit markiertem ^{14}C-(+)-Noradrenalin zeigte sich, wie erwartet, eine gute Übereinstimmung zwischen dem erhaltenen Km-Wert $17{,}3 \pm 3{,}7 \cdot 10^{-7}$ M und dem oben genannten Ki-Wert von (+)-Noradrenalin, wobei

der Vmax-Wert von (+)-Noradrenalin 5,1 ± 0,4 pMol · mg Protein^{-1} · min^{-1} betrug. Der Km-Wert der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von (+)-Noradrenalin war doppelt so hoch wie der Km-Wert der ATP-Mg^{++}-abhängigen Aufnahme von (-)-Noradrenalin. Die Affinität des (-)-Isomers zum Aufnahmesystem ist also zweimal höher als die des (+)-Isomers. Die vorliegenden Versuchsergebnisse ließen jedoch keinen Unterschied in den maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten (Vmax) der verschiedenen Formen von Noradrenalin erkennen.

Die Noradrenalinaufnahme in synaptische Vesikel des Zentralnervensystems ist also stereospezifisch. Die höhere Affinität des (-)-Isomers bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen zur Stereospezifität der Katecholaminaufnahme in synaptische Vesikel sympathischer Nerven. EULER und LISHAJKO (1964) stellten fest, daß die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von (-)-Noradrenalin in die Vesikel der Milznervenendigungen zwei bis dreimal höher ist als die von (+)-Noradrenalin. Bei Versuchen mit niedrigen Konzentrationen von markiertem (±)-Noradrenalin in Gegenwart hoher Konzentrationen von nicht markiertem (+)-, (-)- oder (±)-Noradrenalin fanden STJÄRNE und EULER (1965) einen Affinitätsquotienten (-)-Noradrenalin/(+)-Noradrenalin von 5,9. Ein noch höherer Quotient (9,7) wurde in einer späteren Arbeit von EULER und LISHAJKO (1967) errechnet. Die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von (-)-Noradrenalin in isolierte Membranen der Nebennierenmarksvesikel ist 15 - 20 % höher als die von (+)-Noradrenalin (TAUGNER, 1972). Eine viermal höhere Affinität der Aufnahme des (-)-Isomers in die Vesikel des Nebennierenmarks konnte beobachtet werden, wenn der Aufnahmeprozeß durch Reserpin gehemmt wurde (PHILLIPS, 1974). Es muß jedoch angezweifelt werden, ob ein zuverlässiger Affinitätsquotient ermittelt werden kann, wenn der Aufnahmeprozeß durch Reserpin gehemmt ist.

Die Aufnahme von Noradrenalin ist in Gegenwart von ATP und Mg^{++} in isolierte Vesikel des Rattenherzens vollkommen ste-

reospezifisch, da die Aufnahme von markiertem (-)-Noradrenalin durch nicht markiertes (-)-Noradrenalin doppelt so stark gehemmt wird als durch nicht markiertes (±)-Racemat (BAREIS und SLOTKIN, 1979). Hierzu muß man jedoch bemerken, daß bei Verwendung von Hemmstoffen zwischen nicht vorhandener Affinität und totaler Affinität ein so geringer Unterschied besteht (Faktor von 2), daß minimale Fehler bei dieser komplizierten Technik sich addieren können und danach ein falscher Eindruck entstehen kann. Aus diesem Grunde sollten Affinitätsbestimmungen besser unter Verwendung der verschiedenen Stereoisomeren des Agonisten durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zwar einen geringen, aber echten Grad der Stereospezifität und stimmen mit den Befunden von TAUGNER (1972) überein.

Hemmung der Noradrenalinaufnahme durch Amezinium metilsulfat

Amezinium metilsulfat ist ein indirektes Sympathomimetikum (LENKE et al., 1979), das kardiovaskuläre Wirkungen ausübt (LEHMANN et al., 1979).

LENKE et al. (1979) schlossen aus ihren Untersuchungen, daß Amezinium metilsulfat in die peripheren Nervenzellen aufgenommen wird. Die Wirkung von Amezinium metilsulfat wird durch Desipramin vermindert. Ferner hemmt Amezinium metilsulfat in vivo die Aufnahme von exogenem Noradrenalin in die peripheren Nervenendigungen. Inkubationsversuche zeigten (TRAUT, 1979) eine Hemmung der Noradrenalinaufnahme in Synaptosomen (15.000 g Fraktion) des Rattenherzens und verschiedener Regionen des Rattengehirns sowie des ganzen Gehirns durch Amezinium metilsulfat.

Ich konnte keine Hemmung der ATP-Mg^{++}-unabhängigen Noradrenalinaufnahme in die synaptischen Vesikel des Rattengehirns durch Amezinium metilsulfat finden. Amezinium metilsulfat hemmte jedoch kompetitiv die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme

von (±)-Noradrenalin in die Vesikel des Gehirns, wobei der Ki-Wert 57,7 ± 1,9 · 10^{-7} M betrug. Die Affinitätskonstante wurde von Untersuchungen der Hemmwirkung abgeleitet, da radioaktiv markiertes Amezinium metilsulfat nicht erhältlich war. Für die Aufnahme in die Vesikel des Rattengehirns war die Affinität von Amezinium metilsulfat ca. 3,9 mal geringer als die Affinität von (±)-Noradrenalin. Zusätzliche Versuche mit radioaktivem Amezinium metilsulfat sind erforderlich, um mehr über die Transportmechanismen zu erfahren, die die Aufnahme von Amezinium metilsulfat in die synaptischen Vesikel ermöglichen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Synaptische Vesikel des Rattengehirns nehmen Noradrenalin auf; die Aufnahme wird durch ATP-Mg^{++} gesteigert. Die Akkumulation von markiertem (±)-, (-)- und (+)-Noradrenalin ist sättigungsfähig.

2. Die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von markiertem (±)- und (-)-Noradrenalin ließ sich durch nicht markiertes (+)-Noradrenalin kompetitiv hemmen; die beiden dabei bestimmten Ki-Werte von (+)-Noradrenalin waren nahezu identisch.

3. Der Km-Wert für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von markiertem (+)-Noradrenalin war doppelt so hoch wie der Km-Wert für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von markiertem (-)-Noradrenalin. Die Affinität des (-)-Isomers zum Aufnahmesystem war also zweimal größer als die des (+)-Isomers. Die Affinität des Racemats lag etwa in der Mitte der Affinitäten der beiden Isomere.

4. Die Vmax-Werte für die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von markiertem (±)-, (-)- und (+)-Noradrenalin unterschieden sich nicht voneinander.

5. Amezinium metilsulfat hemmt die ATP-Mg^{++}-abhängige Aufnahme von markiertem (±)-Noradrenalin kompetitiv. Die Affinität des Ameziniums zum Aufnahmesystem ist ca. 3,9 mal geringer als die von (±)-Noradrenalin.

Herrn Professor Dr. PHILIPPU gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und die vielen Ratschläge, die für das Gelingen dieser Arbeit von ausschlaggebender Bedeutung waren.

Dem Direktor des Pharmakologischen Institutes der Universitätskliniken Würzburg, Herrn Professor Dr. U. TRENDELENBURG, danke ich dafür, daß ich in seinem Institut arbeiten durfte.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

BAREIS, D.L., SLOTKIN, T.A.: Synaptic vesicles isolated from rat heart: l-(^{3}H)norepinephrine uptake properties. J. Neurochem. 32, 345-351 (1979)

CARLSSON, A., HILLARP, N.A., WALDECK, B.: A Mg^{++}-ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla. Med. Exp. (Basel) 6, 47-53 (1962)

CARLSSON, A., HILLARP, N.A., WALDECK, B.: Analysis of the Mg^{++}-ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla. Acta Physiol. Scand. 59, Suppl. 215, 1-38 (1963)

DA PRADA, M., OBRIST, R., PLETSCHER, A.: Discrimination of monoamine uptake by membranes of adrenal chromaffin granules. Br. J. Pharmacol. 53, 257-265 (1975)

EULER, U.S. v., LISHAJKO, F.: Catecholamine release and uptake in isolated adrenergic nerve granules. Acta Physiol. Scand. 57, 468-480 (1963a)

EULER, U.S. v., LISHAJKO, F.: Effect of adenine nucleotides on catecholamine release and uptake in isolated adrenergic nerve granules. Acta Physiol. Scand. 59, 454-461 (1963b)

EULER, U.S. v., LISHAJKO, F.: Uptake of l- and d-isomers of catecholamines in adrenergic nerve granules. Acta Physiol. Scand. 60, 217-222 (1964)

EULER, U.S. v., LISHAJKO, F.: Reuptake and net uptake of noradrenaline in adrenergic nerve granules with a note on the affinity for l- and d-isomers. Acta Physiol. Scand. 71, 151-162 (1967)

EULER, U.S. v., LISHAJKO, F.: Effects of some metabolic cofactors and inhibitors on transmitter release and uptake in isolated adrenergic nerve granules. Acta Physiol. Scand. 77, 298-307 (1969)

HUNTER, A., DOWNS, C.E.: The inhibition of arginase by amino acids. J. Biol. Chem. 157, 427-446 (1945)

KIRSHNER, N.: Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. J. Biol. Chem. 237, 2311-2317 (1962)

LENTZEN, H., PHILIPPU, A.: Uptake of tyramine into synaptic vesicles of the caudate nucleus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300, 25-30 (1977)

LENTZEN, H., PHILIPPU, A.: Physico-chemical properties of phenethylamines and their uptake into synaptic vesicles of the caudate nucleus. Biochem. Pharmacol. 30, 1759-1764 (1981)

LEHMANN, H.D., SCHUSTER, J., GIERTZ, H.: Haemodynamic effects of new sympathomimetics: Amezinium metilsulfate (Lu 1631). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, Suppl., R 16 (1979)

LENKE, D., GRIES, J., KRETZSCHMAR, R.: Pharmacological studies on the mechanism of action of Amezinium metilsulfate (Lu 1631). A new compound with sympathomimetic action. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, Suppl., R 12 (1979)

LINEWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurements with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

LUNDBORG, P., STITZEL, R.: Uptake of biogenic amines by two different mechanisms present in adrenergic granules. Br. J. Pharmac. Chemother. 29, 342-349 (1967)

MAYNERT, E.W., KURIYAMA, K.: Some observations on nerve-ending particles and synaptic vesicles. Life Sci. 4, 1067-1087 (1964)

MIRKIN, B.L., GIARMAN, N.J., FREDDMAN, D.X.: Factors influencing the uptake of noradrenaline by subcellular particles in homogenates of rat brain. Biochem. Pharmacol. 13, 1027-1035 (1964)

PHILIPPU, A., PFEIFFER, R., SCHÜMANN, H.J., LICKFELD, K.: Eigenschaften der Noradrenalin speichernden Granula des sympathischen Ganglion stellatum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak. 258, 251-265 (1967)

PHILIPPU, A., BURKAT, U., BECKE, H.: Uptake of norepinephrine by isolated hypothalamic vesicles. Life Sci. 7, 1009-1017 (1968)

PHILIPPU, A., BECKE, H., BURGER, A.: Effect of drugs on the uptake of noradrenaline by isolated hypothalamic vesicles. Eur. J. Pharmacol. 6, 96-101 (1969)

PHILIPPU, A., BEYER, J.: Dopamine and noradrenaline transport into subcellular vesicles of the striatum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 387-402 (1973)

PHILIPPU, A., MATTHAEI, H.: Uptake of serotonin, gamma-aminobutyric acid and histamine into synaptic vesicles of the pig caudate nucleus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287, 191-204 (1975)

PHILLIPS, J.H.: Steady-state kinetics of catecholamine transport by chromaffin-granule "ghost". Biochem. J. 144, 319-325 (1974)

SEIDLER, F.J., KIRKSEY, D.F., LAU, CH., WHITMORE, W.L., SLOTKIN, T.A.: Uptake of (-)^{3}H-norepinephrine by storage vesicles prepared from whole rat brain: properties of the uptake system and its inhibition by drugs. Life Sci. 21, 1075-1086 (1977)

SLOTKIN, T.A., SEIDLER, F.J., WHITMORE, W.L., SALVAGGIO, M., LAU, CH.: Ionic and nucleotide cofactor requirements for uptake of (^{3}H)-norepinephrine by rat brain synaptic vesicle preparations. Mol. Pharmacol. 14, 868-878 (1978a)

SLOTKIN, T.A., SEIDLER, F.J., WHITMORE, W.L., LAU, CH., SALVAGGIO, M., KIRKSEY, D.F.: Rat brain synaptic vesicles: Uptake specificities of (^{3}H)-norepinephrine and (^{3}H)-serotonin in preparations from whole brain and brain regions. J. Neurochem. 31, 961-968 (1978b)

SLOTKIN, T.A., SALVAGGIO, M., LAU, C., KIRKSEY, D.F.: ^{3}H-Dopamine uptake by synaptic storage vesicles of rat whole brain and brain regions. Life Sci. 22, 823-830 (1978c)

STJÄRNE, L., EULER, U.S. v.: Stereospecificity of amine uptake mechanism in nerve granules. J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 335-340 (1965)

TAUGNER, G.: The membrane of catecholamine storage vesicles of adrenal medulla: Uptake and release of noradrenaline in relation to the pH and the concentration and steric configuration of amine present in the medium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 299-314 (1972)

TRAUT, M.: Inhibition of noradrenaline uptake and of monoamine oxidase by Amezinium metilsulfate (Lu 1631). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, Suppl., R 12 (1979)

WILKINSON, G.N.: Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochem. J. 80, 324-332 (1961)

L E B E N S L A U F

Am 5.6.1952 wurde ich, Stephan Andi Pramono, als Sohn der Eheleute Adi und Melani Pramono, geb. Go, in Kudus/Indonesien geboren.

1958 - 1964 besuchte ich die Volksschule und
1964 - 1967 die Mittelschule in Kudus.

1967 trat ich in das Ignatius-von-Loyola-Gymnasium in Semarang/Indonesien über, das ich
1970 mit dem Abitur verließ.

1971 - 1972 erlernte ich die deutsche Sprache am Goethe-Institut in Prien am Chiemsee.

1972 - 1973 besuchte ich das Studienkolleg in München. Mit dem Bestehen der Prüfung zur Feststellung der Hochschulreife erhielt ich die Berechtigung zum Studium in der Bundesrepublik Deutschland.

1973 begann ich das Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Während des klinischen Teils meines Studiums arbeitete ich in meiner freien Zeit an dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.

Im April 1981 bestand ich die ärztliche Prüfung an der Universität Würzburg.

Seit September 1981 bin ich als Assistenzarzt in der Urologischen Abteilung der Universitätsklinik in Göttingen tätig.

Stefan Andi Pramono

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80